

- A) Einflüsse von (nicht markiertem) Buttergelb auf die Art und relativen Mengen der cytoplasmatischen Proteine der Rattenleber. (Chromatographie-Versuche).
- B) Untersuchung der Bindung von C^{14} - markiertem Dimethylaminoazobenzol an die cytoplasmatischen Proteine der Rattenleber.

von

Tschangis Amiri

=

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem
Physiologisch-chemischen Institut der
Universität München
Direktor: Professor Dr.Dr.h.c. A. Butenandt

- A) Einflüsse von (nicht markiertem) Buttergelb auf die Art und relativen Mengen der cytoplasmatischen Proteine der Rattenleber. (Chromatographie-Versuche).
- B) Untersuchung der Bindung von C^{14} - markiertem Dimethylaminoazobenzol an die cytoplasmatischen Proteine der Rattenleber.

INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Tschangis Amiri
geboren in Teheran

München 1960



Dekan
1. Referent
2. Referent

Prof. Dr. Dr. Eyer
Prof. Dr. Adolf Butenandt
Prof. Dr. Fritz Turba

Tag der mündlichen Prüfung: 8.11.1960

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. F. Turba in der Zeit von September 1957 bis Januar 1959 im Physiologisch-chemischen Institut der Universität München durchgeführt.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt,
Direktor des Max-Planck-Institutes für
Biochemie und des Physiologisch-chemischen
Institutes der Universität München
und Herrn Professor Dr. F. Turba,
Direktor des Physiologisch-chemischen
Institutes der Universität Würzburg
danke ich herzlich für die wohlwollende
Förderung und Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Dr. P. W. Jungblut bin ich für die
praktischen Ratschläge zu besonderem Dank
verpflichtet.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsübersicht.

	Seite
Einleitung	
A) Zusammenhänge zwischen Konstitution und cancerogener Wirksamkeit bei Azofarbstoffen vom Typus des Dimethylamino-azobenzol (DAB).	1
B) Summationseffekte bei Buttergelb-Fütterung	2
C) Verhalten des Buttergelbs im Stoffwechsel	3
a) Sprengung der Azobrücke	3
b) oxydative Demethylierung	3
c) Hydrolysierung	4
d) Fixierung an die Leberproteine	4
Durchführung der Versuche	
A) Biologische Methoden	9
a) Versuchstiere, Fütterung	9
b) Darstellung der Cytoplasma-Fraktion aus Rattenleberzellen	9
c) Durchströmung der isolierten Leber	10
B) Chemische Methoden	12
a) Trennung der cytoplasmatischen Proteine durch Chromatographie an Celluloseaustauscher-Säulen	12
b) Herstellung von C^{14} - markiertem Buttergelb (DAB) aus C^{14} - Anilin	14
C) Bestimmung der Radioaktivität	16
a) Bestimmung der spezifischen Aktivität von C^{14} - DAB	16
b) Bestimmung des C^{14} - Gehaltes der durch Säulenchromatographie getrennten cytoplasmatischen Protein-Komponenten	17
Ergebnisse und Diskussion	
A) Einflüsse von (nicht markiertem) Buttergelb auf die Art und relativen Mengen der cytoplasmatischen Proteine (Chromatographie-Versuche)	18
B) Untersuchung der Bindung von C^{14} - markiertem Dimethylamino-azobenzol an die cytoplasmatischen Proteine	22

	Seite
a) Versuche in vivo	22
b) Versuche an der isoliert durchströmten Leber	23
Zusammenfassung	27
Literatur	28

Das Experiment ist:

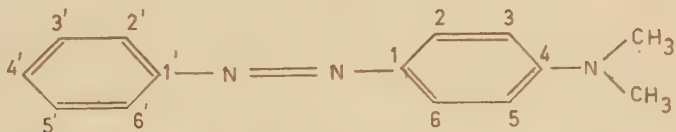
"die spezifische Methode, um kausale Beziehungen zu ermitteln. Beim experimentellen Eingriff verhält sich der Forscher nicht mehr nur rein beobachtend, sondern er schaltet sich handelnd in den Gang des Geschehens ein. Er verändert einen Teil des Geschehensablaufes an selbstgewählter Stelle, in selbstgewählter Weise und schließt aus den folgenden Veränderungen auf den inneren Zusammenhang."

S p e m a n n.

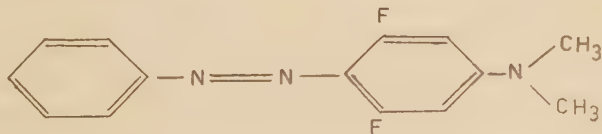
A) Zusammenhänge zwischen Konstitution und cancerogener Wirksamkeit bei Azofarbstoffen vom Typus des Dimethyl-amino-azobenzols (DAB).

Die cancerogenen Azofarbstoffe gehören im Wirkungstypus zu den krebserzeugenden aromatischen Aminen. Das stark wirk-
same 4-Dimethylamino-azobenzol (im folgenden als DAB be-
zeichnet), auch Buttergelb genannt, wurde zuerst 1936 von
R. KINOSITA¹⁾ bei Ratten als cancerogen erkannt.

Der Grundkörper der Reihe, Azobenzol selbst, ist unwirk-
sam. Alle stark wirksamen Verbindungen leiten sich vom
4-Aminoazobenzol ab, wobei Substitution des Rings an bestimm-
ten Stellen bereits krebserzeugende Aktivität bedingen kann.
Hochwirksame Derivate besitzen wenigstens eine Methylgruppe
am Stickstoff der Aminogruppe.



Untersuchungen von MILLER u.a.²⁾ an Fluor-substituierten
Derivaten weisen auf die Bedeutung der freien 2-Stellung des
Ringes für die hepato-carcinogene Wirksamkeit hin, denn nur
die in den äquivalenten 2- bzw. 6-Positionen substituierten
Farbstoffe hatten verringerte bzw. fehlende Wirkung. Die
Stelle der Anheftung der Farbstoffe an die betroffenen Zell-
bestandteile ist bis jetzt nicht gesichert, doch weist auch
das Fehlen einer Farbstoffbindung beim 2,6-Difluor-4-dimethyl-
amino-azobenzol



auf die Bedeutung der unsubstituierten 2-Stellung. Die An-
nahme TERAYAMA's³⁾, daß die 3-Stellung zur Bindung prädesti-

niert sei, bedarf weiterer Argumente.

Die Azobrücke hat für die krebserzeugende Wirkung keine spezielle Bedeutung, sie kann durch eine Äthylenbrücke⁴⁾ ersetzt werden. Wichtig ist die Erhaltung der ebenen Transkonfiguration. Die zugrundeliegenden Amine sind unwirksam. Der aromatische Charakter ist wesentlich, Hydrierung inaktiviert. Einführung solubilisierender, insbesondere saurer Gruppen zerstört ebf. die Wirksamkeit. Monomethyl- und Dimethylamino-Derivate sind wirkungsgleich: Sie können im Stoffwechsel ineinander übergehen.

B) Summationseffekte bei Buttergelb-Fütterung.

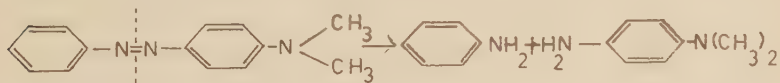
Die carcinogene Wirksamkeit von Buttergelb stellt nach Befunden von DRUCKREY⁵⁾ eine Funktion der gesamten verabreichten Menge, nicht der Zeit dar, wie aus Dauerfütterungsversuchen mit verschiedenen großen Einzeldosen abgeleitet wurde: Das Produkt aus tägl. Dosis (c) und Verabreichungsdauer (t) soll konstant sein: $c \cdot t = \text{const.}$ Die Gesamtdosis, die zur Bildung von Hepatomen notwendig ist, hängt vom Rattenstamm und den Versuchs-, insbesondere den Fütterungsbedingungen ab (hoher Lactoflavingehalt des Futters z.B. hemmt die Entstehung von Lebertumoren⁶⁾; sie beträgt etwa 350-1200 mg DAB pro Ratte. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß es sich beim DAB um ein "Summationsgift" handeln müsse; die Schädigung durch kleine Einzeldosen sollte danach irreversibel sein und sollte summationsfähig über die Gesamtlebensdauer des betreffenden Individuums anhalten. Setzt man die Fütterung mit Buttergelb vor Erreichung der kritischen Schwellendosis ab, so verhalten sich die Tiere zunächst normal, bekommen aber später (die Zeitdauer ist umso kleiner, je höher die verabreichte Gesamtdosis an DAB war) Hepatome⁷⁾.

Man hat aus all diesen Befunden geschlossen, daß bei den von der Buttergelb-Behandlung betroffenen Zellen überhäufige Zellteilungen ausgelöst werden durch einen Mechanismus, der auf die Tochterzellen folgender Generationen übertragbar sein

muß. Dies würde bedeuten, daß die Schädigungen (Noxen) vermehrungsfähige, selbstproduzierende "Duplikanden" der Zellen betreffen. Da ein rechnerischer Überschlag zeigt, daß für jede Zelle eine Vielzahl von entsprechenden "Treffern" nötig ist, kommt weit eher ein Angriff auf Duplikanden der Zelle in Frage, die vielfach in ihr vorhanden sind (etwa cytoplasmatische oder jedenfalls außerhalb des Kerns lokalisierte reduplizierende Einheiten), als etwa Gen-Mutationen⁸⁾, die in den Chromosomen zu lokalisieren sind. Über das Wesen dieser Duplikanden und ihre Beeinflussung durch DAB ist nichts Sicheres bekannt.

C) Verhalten des Buttergelbs im Stoffwechsel.

a) Der Hauptteil des applizierten DAB (etwa 50 %) erleidet eine reduktive Sprengung der Azobrücke⁹⁾.



Die entsprechenden aromatischen Amine erscheinen in konjugierter Form im Harn. An der Spaltung, die sich auch in vitro mit Leberschnitten oder -Homogenaten nachahmen läßt, ist Triphosphopyridinnucleotid (TPN) und Lactoflavin-adenin-dinucleotid beteiligt; die Schutzwirkung von verfüttertem Lactoflavin gegenüber der Tumor-Induktion durch DAB dürfte wenigstens teilweise auf der Förderung des Abbaues des Azofarbstoffes zu den unwirksamen Aminen beruhen. Interessanterweise steigt die Aktivität der Fermente, welche die Azobrücke sprengen (ebenso wie die Konzentration der demethylierenden Enzyme, s. unter b), nach Behandlung der Ratten mit dem (an sich ebenfalls carcinogenen) Methylcholanthren, das eigenartigerweise die Entwicklung von Hepatomen durch 3-Methyl-DAB hemmt¹⁰⁾.

b) DAB wird oxydativ (unter Bildung von Formaldehyd) zu Monomethylamino-azobenzol und Aminoazobenzol demethyliert; die

entsprechenden Fermentsysteme sind vorwiegend in den Mikrosomen lokalisiert (CONNEY u.a.¹¹⁾, HULTIN¹²⁾). Optimale Demethylierung bedarf der Gegenwart von Sauerstoff und von TPN sowie von Adenosintriphosphat und Magnesium-Ionen. Nur ein geringer Teil der Methylgruppen erscheint im Cholin und als C-Atom des Serins der Leberproteine.

c) DAB wird in geringem Umfang durch Hydroxylierung in 2'-bzw. 4'-Stellung inaktiviert⁴⁾.

d) DAB wird an die Leberproteine fixiert¹³⁾¹⁴⁾. Obwohl nur etwa 1% des Azofarbstoffes in dieser Weise reagiert, scheint dieser Vorgang für die Carcinogenese von größter Bedeutung zu sein. Der Gehalt an gebundenem Farbstoff geht der Rate der Tumorbildung parallel. Tierarten, bei denen DAB nicht hepatocarcinogen wirkt, zeigen keine Farbstoffbindung in der Leber (z.B. Hamster). Nicht krebserzeugende Strukturverwandte (4-Aminoazobenzol) werden nur wenig fixiert, hochwirksame Derivate werden verstärkt gebunden. Lactoflavin, das die Tumorbildung hemmt, vermindert auch das Ausmaß der Farbstoffbindung¹⁵⁾.

Über den zeitlichen Ablauf der Bindung von DAB brachten Versuche von HULTIN¹⁶⁾ Aufschluß. Danach wird radioaktiv markiertes Buttergelb (C¹⁴ im Phenylring) in den ersten Stunden nach in-vivo Applikation in den Mikrosomen, den Stellen der vorwiegenden Synthese der cytoplasmatischen Proteinsynthese, angereichert. Danach findet eine Verschiebung der Farbstoffbindung ins Cytoplasma statt. Wie MILLER u.a.¹⁷⁾ schon früher festgestellt hatten, nimmt die Konzentration an cytoplasmatischen Protein-Farbstoffsymplexen mit der Dauer der Fütterung von DAB zu, erreicht nach 3-5 Wochen einen Höhepunkt und fällt anschließend wieder ab; die Tumoren sind völlig frei davon und enthalten auch die zur Farbstoffbildung befähigten Proteine in nur kleiner Konzentration.

Die Farbstoffkomponente ist nicht an Protein adsorbiert; sie ließ sich erst durch energische Spaltungsreaktionen (Hy-

drollyse mit Alkali, tryptische Verdauung) vom Protein lösen¹⁸⁾ (ein Teil war allerdings über SH-Gruppen gebunden und wurde durch Behandlung mit Thioglycolsäure in Freiheit gesetzt¹⁹⁾). Ein Teil des durch Hydrolyse abgelösten Azokörpers unterschied sich durch größere Polarität von DAB; daneben traten geringe Mengen Monomethylaminoazobenzol und Aminoazobenzol auf; die Absorptionsmaxima lagen im Sauren bei 514-517 m μ sowie bei 270-280 m μ , im Alkalischen bei 400 m μ und 280 m μ .

KUSAMA und TERAYAMA¹⁹⁾ sowie HUGHES²⁰⁾ prüften die Bindungsart des Farbstoffes näher. Die besondere Schwierigkeit dieser Untersuchungen lag in der geringen Menge proteinfixierten Azokörpers (etwa 8 γ /Tier) und der Uneinheitlichkeit der gefärbten Fraktionen alkalischer oder proteolytischer Hydrolysate²¹⁾. Obwohl farbstoffhaltige Peptidfraktionen durch Chromatographie gewonnen werden konnten (sie enthielten Prolin, Glycin, Phenylalanin, Glutaminsäure, Leucin, Valin, Serin, Alanin und Spuren Asparaginsäure), steht der sichere Nachweis der Bindung des Farbstoffes an die isolierten Peptide noch aus. Von Seiten des Farbstoffes wurde eine Bindung in 2-(eventuell auch in 3-) Stellung des Rings vorgeschlagen (s.o.).

Zur Charakterisierung der DAB-bindenden cytoplasmatischen Proteine (die nach längerer Fütterungsdauer den größten Teil ausmachen²²⁾), erwies sich die Elektrophorese als bestes Mittel. 70-90% des gebundenen Farbstoffes war an die sehr langsam wandernden sog. "h"-Komponenten gebunden²³⁾, die nur 7-15% der Gesamteiweißmenge des Cytoplasmas ausmachen. SOROF u.a.²⁴⁾ konnten die h-Proteinfraktion durch lang ausgedehnte Elektrophoreseversuche in insgesamt 6 Unterkomponenten trennen, deren eine -"langsame h₂-Fraktion" genannt - bei Fütterung des Tieres mit carcinogenen Azofarbstoffen, nicht aber bei Verabreichung des nicht krebsauslösenden 2-Methyl-4-dimethylamino-azobenzols, zunahm. Die vereinigten h₂+ h₃-Komponenten enthielten nur 0,02% Ribo- und 0,07% Desoxyribonucleinsäure. Die biochemischen Ursachen der Konzentrationsänderung der langsamen h₂-Fraktion

ist nicht abgeklärt; Regenerationsvorgänge²⁵⁾, Farbstoff-Toxizität und verminderte Nahrungsaufnahme scheiden aus. Als notwendige, aber nicht unbedingt hinreichende Bedingung erscheint die Farbstoff-Bindung an diese h_2 -Komponente.

Auch durch Ultrazentrifugieren²⁶⁾ ließ sich aus den Cytoplasma-Proteinen eine schwer sedimentierbare Fraktion (Sedimentationskonstante 3,6, daher "3,6-Proteine") abtrennen, die den Hauptteil gebundenen Farbstoffes enthält; sie bestand zu 25% aus der elektrophoretisch zu gewinnenden h -Komponente.

An Stelle langdauernder Fütterung mit jeweils kleinen DAB-Dosen gelang ein Einbau von Farbstoff in die Leber-Proteine auch durch einmalige Verabreichung relativer großer Dosen (30-40 mg DAB/Tier)²⁷⁾; schon nach 24 Stunden waren die erreichten Farbstoffkonzentrationen vergleichbar mit denen nach Dauerfütterung. Dabei glichen sich die in vivo nach beiderlei Verfahren gewonnenen Farbstoffderivate weitgehend (GELBONI, MILLER u. MILLER²⁸⁾); TERAYAMA²⁹⁾). Dagegen unterschieden sich die durch in vitro-Incubation gewonnenen Protein-Farbstoffsymplexe von den in vivo entstandenen (HULTIN³⁰⁾, GELBONI, MILLER u. MILLER³¹⁾). Wurde die Fixierung des Farbstoffes mittels eines Systems isolierter Mikrosomen in Gegenwart von Triphosphopyridin-nucleotid (TPN) vorgenommen, so bildeten sich u.a. ungefärbte Spaltprodukte des Azokörpers (s.o.), die ebenfalls vom Protein gebunden wurden und die Verwendung von C^{14} -DAB erschwerten oder unmöglich machten.

Die ursprünglich von MILLER und Mitarbeitern entdeckte Fixierung bestimmter Azokörper, wie DAB, an die Leberproteine wurde inzwischen von einer Vielzahl von Autoren bestätigt. Nach HUGHES³²⁾ ist eine Verbesserung der Aufteilung der Zell-Granula durch Homogenisierung der Leber in einem Medium aus 10% Polyvinylpyrrolidon und 0,25 m Rohrzuckerlösung möglich; nach seinen Befunden lag der Farbstoffgehalt in den einzelnen Zellfraktionen (ausgedrückt durch die Extinktion bei $520m\mu$ / 100 mg Zellfraktion) bei 0,30 - 0,38 im Homogenat, bei 0,19 - 0,21 in den Zellkernen, bei 0,12 - 0,15 in den Mitochondrien, bei 0,34 - 0,44 in den Mikrosomen und bei 0,37 - 0,52 im Cytoplasma. Über die zeitliche Veränderung der Farbstoffkonzentration in den Zellfraktionen (HULTIN) s.o.

Die unter dem Einfluß von DAB beobachtete Verschiebung des "Spektrums" der löslichen Zellproteine, wie sie im elektrophoretischen Verhalten (Verminderung der langsam wandernden "h"-Proteine, Vermehrung der schnell wandernden "A"- und "N"-Proteine, vgl. SOROF³³), erkennbar wird, gewinnt dadurch besondere Bedeutung, daß ähnliche quantitative Veränderungen auch bei Mäuse- und Rattentumoren andersartiger Genese festgestellt werden konnten. Elektrophoretisch ähnlich verhielten sich z.B. transplantable Tumoren (JENSEN-Sarkom, WALKER-Carcinosarkom, JOBLING-Carcinom u.a.³⁴).

Interessant ist ferner, daß auch bei Ultrazentrifugierung 2 der normalerweise zu beobachtenden 4 Nucleoproteid-Komponenten aus Cytoplasma (Sedimentationskonstanten 28, 40, 54 und 70 S) bei allen Tumoren, allerdings auch bei regenerierender Leber, beträchtlich vermehrt sind (PETERMANN u.a.³⁵).

Besonders aufschlußreich sind Untersuchungen von ARCOS und ARCOS⁴⁶) zum Mechanismus der DAB-Wirkung auf Lebermikrosomen, wobei die Untersuchung der Quellsfähigkeit (gemessen durch Verringerung der Extinktion einer Mikrosomensuspension in Puffer pH 8,2 bei $515\text{-}\mu\text{m}$) als Test diente. Parallel der Bindung von 3-Methyl-DAB an die Lebercytoplasma-Proteine fanden die Autoren eine Abnahme der Geschwindigkeit und des Ausmaßes der Quellsfähigkeit der Mikrosomen sowie eine deutliche Änderung der pH-Abhängigkeit dieses Vorganges. Das Minimum wurde nach einer Fütterungsdauer von 4 Wochen erreicht; dann fand eine gegenläufige Änderung statt, bis nach 20-24 Wochen der ursprüngliche Stand wieder erreicht war. Das inaktive 2-Methyl-DAB zeigte dieses Verhalten nicht. Normale und Tumormikrosomen unterschieden sich trotz der Ähnlichkeit im Quellungsverhalten sehr deutlich dadurch, daß im ersteren Fall nur kleinere Mengen, bei Tumormikrosomen aber große Mengen an Protein dabei freigesetzt wurden. Im Zusammenhang mit dem Befund, daß praktisch aller proteingebundener Farbstoff aus Mikrosomen durch Desoxycholat in Freiheit gesetzt wird, läßt sich aus den angeführten Ergebnissen schließen, daß sich der Angriff der Azofarbstoffe auf die Änderung der makromolekularen Feinstruktur der Mikrosomen richtet, die durch spezifische Lipide aufrecht erhalten wird.

Im Zusammenhang mit Veränderungen des Eiweißspektrums von Leberzellen unter Einfluß von DAB sind schließlich Versuche von WEILER³⁷⁾ zu nennen, die ergaben, daß nach Fütterung mit den Azofarbstoffen Gruppen von Leberzellen die Fähigkeit normaler Zellen verloren, Kaninchenantiserum-Globulin - Fluoreszein-Symplexe zu binden, obwohl sie morphologisch nicht zu unterscheiden waren. Der induzierte Tumor zeigt die gleiche Eigenschaft.

HUGHES³⁸⁾, der eine Beziehung zwischen dem Auftreten dieser "nichtfärbenden" Zellen und der hepato-carcinogenen Wirkung des Farbstoffes bestätigte, konnte aber schließlich zeigen, daß Globulin nicht gegen Rattenlebermikrosomen immunisierter Kaninchen den gleichen Effekt ergab, sodaß es sich (der Annahme WEILER's entgegen) nicht um ein immunbiologisches Phänomen handeln kann. Allerdings ergibt sich ein interessanter Hinweis auf einen Unterschied der Proteine "färbender" und "nichtfärbender" Zellen, der möglicherweise im isoelektrischen Punkt seine Ursache hat.

Durchführung der Versuche

A) Biologische Methoden.

a) Versuchstiere, Fütterung.

Als Versuchstiere dienten weibliche Ratten des "Wistar"-Stammes bzw. Inzuchtratten eines Stammes von Bayer-Leverkusen (Zuchtstamm von Professor Ruhenstroth, Max Planck-Institut für Biochemie). Ihr Alter zu Versuchsbeginn betrug etwa 100 Tage, ihr Gewicht 250 bis 300 g.

Zur Verfütterung wurde jeweils frisch 1 g Dimethylaminoazobenzol (DAB) p.a., Schmelzpunkt -konstant und chromatographisch rein, vgl. S. 15 in einem aus 3 g reiner, löslicher Kartoffelstärke mit 100 ml dest. Wassers hergestellten Kleister unter allmählicher Zugabe im Mörtser sehr sorgfältig gleichmäßig verrührt; die Suspension enthielt demnach im ml 10 mg Buttergelb und wurde den Versuchstieren mit der Magensonde verabfolgt und zwar nach folgendem Fütterungsplan (Tab. 1).

Tab. 1: Fütterungsplan für die Verabreichung von Buttergelb

Zahl der Tiere	Tagesdosis mg	Gesamtdosis mg	Zahl der Kontrolltiere
2	10	15	1
4	10	100	2
2	10	600	1
8	10	1 000	4

b) Darstellung der Cytoplasma-Fraktion aus Rattenleberzellen.

Nach Beendigung der jeweiligen Fütterungsperiode blieben die Tiere 3-4 Tage unbehandelt, um den akut-toxischen Effekt des Farbstoffes abklingen zu lassen; 12 Stunden vor Versuchs-

beginn wurde den Tieren die Nahrung entzogen.

Nach Eröffnung der Peritonealhöhle wurde die Leber der Versuchstiere von der Pfortader aus unter einem Druck von etwa 12 Torr mit 0,25 m Saccharoselösung blutfrei gespült. Man zerkleinerte das Organ grob mit einer Schere, fügte 3 Volumina 0,25 m Saccharoselösung hinzu und homogenisierte das Gewebe in einem Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM in der üblichen Weise zum Aufschluß der Zellen. Diese und alle folgenden Operationen erfolgten bei 0°. Die partikulären Zellelemente wurden durch Differentialzentrifugieren in der präparativen Ultrazentrifuge (Spinco-Beckman) vom Überstand der löslichen Zellproteine getrennt; als Cytoplasma-Fraktion wird im Folgenden die Lösung über dem Mikrosomen-Sediment bezeichnet, die bei 45 Minuten dauerndem Zentrifugieren bei 105 000 x g erhalten wurde. Dieser Überstand wurde zweimal erschöpfend gegen destilliertes Wasser dialysiert und der Inhalt des Dialysenschlauches lyophilisiert.

c) Durchströmung der isolierten Leber.

Ein Versuchstier diente in dieser Anordnung jeweils als Spender der Leber, vier Versuchstiere als Blutspender. Abbildung 1 zeigt die verwendete Apparatur. Aus dem Vorratsgefäß gelangt das Blut durch die Tätigkeit eines künstlichen "Herzens" in die "Lunge", wo es durch den entgegenströmenden Sauerstoff oxydiert wird, und fließt schließlich unter dem konstanten Überdruck eines Niveaugefäßes in die Leber, aus der es in das Vorratsgefäß abtropft. Zwei Kegelventile, den Herzklappen entsprechend, werden vom "künstlichen Herzen" gegenläufig gehoben und gesenkt (geöffnet und gesperrt). Das "Herz" besteht aus einer Injektionsspritze, deren Kolben durch einen Exzenter angetrieben wird.

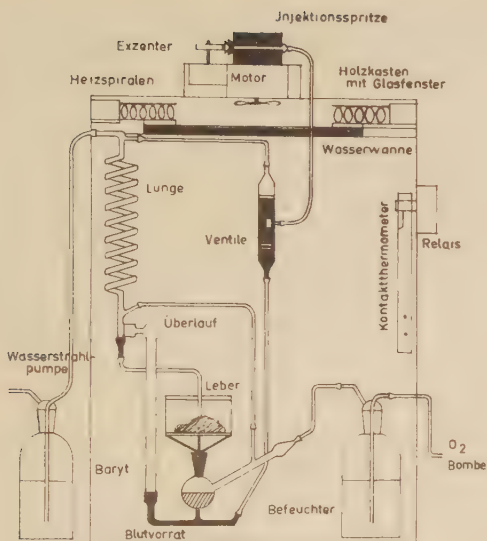


Abb. 1: Apparatur zur isolierten Durchströmung einer Rattenleber.

Die "Lunge" ist ein Spiralrohr, an dessen oberem Ende die Blutzuleitung und die Gasableitung, an dessen unterem Ende die Gaszuleitung und das Blut-Niveaugefäß ansetzen. Vorratsgefäß, "Herz" und "Lunge" werden durch Silikonschläuche miteinander verbunden; alle Glasteile sind zur Verhinderung der Blutgerinnung innen silikonisiert. Der Sauerstoffstrom wird zunächst mit Wasserdampf gesättigt und gelangt nach Passieren der "Lunge" in eine Waschflasche mit Barytlösung zur Füllung des Kohlendioxyds als BaCO_3 . Die Leber liegt in einer "feuchten Kammer" aus Plexiglas auf einer Siebscheibe. Die ganze Apparatur befindet sich in einem Schrank, dessen Atmosphäre mit Wasserdampf gesättigt ist und dessen Innenraum mittels eines Kontaktthermometers auf 38° temperiert wird.

In Äther-Narkose wurden dem Versuchstier möglichst weitlumige Polyäthylenschläuche in die Vena portae, die Vena hepatica (von der Vena cava inferior her) und in den Ductus choledochus

eingebunden, die Leber ohne Beschädigung des Parenchyms rasch präpariert und innerhalb weniger Minuten nach Einbinden der Schläuche an die Durchströmungs-Apparatur angeschlossen. Durchströmt wurde von der Vena portae aus mit einem Druck von etwa 20 cm Wassersäule. Das Blut-Durchflußvolumen betrug 5-6 ml/Min. Das Blut von 4 Spender-Tieren (27 ml) wurde mit 9 ml einer Lösung von 300 mg Xylanpolyschwefelsäureester ("Thrombocid") in 0,9 %iger Kochsalzlösung verdünnt.

B) Chemische Methoden.

a) Trennung der cytoplasmatischen Proteine durch Chromatographie an Celluloseaustauscher-Säulen.

Die Herstellung von Diaethylaminoäthyl-Cellulose (DEAE-SF) erfolgte im Wesentlichen nach der Vorschrift von PETERSON und SOBER. Dazu wurden 80 g Natriumhydroxyd in 340 ml Wasser gelöst und die Lauge mit insgesamt 120 g Cellulosepulver ("Solca floc") in mehreren Portionen innig vermischt. Das noch trocken wirkende Gemisch wurde 30 Minuten lang im Eisbad gut gerührt, und darauf eine Lösung von 70 g 2-Chlortriäthylamin-hydrochlorid (umkristallisiert, Lösung mit Tierkohle behandelt) in mehreren Portionen hinzugefügt. Unter Rühren stellte man das Gemisch 35 Minuten lang in ein Wasserbad von 85° ein, kühlte darauf erneut im Eisbad und gab 500 ml 2-normale Kochsalzlösung in mehreren Anteilen zu. Nach Zentrifugieren des Niederschlags und abwechselndem Waschen mit je 500 ml 1 n-NaOH und 1 n-NaCl suspendierte man den Austauscher in 500 ml 1 n-NaOH und goß die Suspension in 6 l Wasser ein. Nach 12 Stunden wurde der Überstand entfernt, der Niederschlag mehrmals in der Zentrifuge mit Wasser und darauf mit Äthanol gewaschen und schließlich bei 70° im Vacuum getrocknet.

Eine Menge an Austauscher, die zur Füllung von 2 Säulen von 35 x 1,4 cm ausreichte, wurde in 0,005 m Ammonacetat-

puffer pH 7,0 suspendiert und nach Sedimentieren der Suspension sofort erneut mit frischem Puffer verrührt und davon dekantiert, bis die überstehende Flüssigkeit genau ein pH von 7,0 ($\pm 0,01$) aufwies (Messung mit der Glaselektrode). Dann wurden jeweils zwei 50 cm lange Glasrohre (Chromatographiesäulen) mit der Suspension gefüllt, sodaß beide Säulen genau gleiche Höhe (etwa 35 cm) erreichten. Man spülte nach 12 stündigem Stehen erneut mit 0,005 m Ammonacetatpuffer, bis einfließende und ausfließende Lösung genau gleiches pH ($7,0 \pm 0,01$) hatten.

50 bis 100 mg salzfreien lyophilisierten Proteins, gelöst in etwa 5 ml 0,005 m Ammonacetatpuffer pH 7,0, wurden ohne Aufwirbeln der Oberfläche auf die Austauschersäule aufgetragen; mit zwei je 5 ml des gleichen Puffers wurde zweimal nachgespült. Darauf wurden die Mischgefäße (Abb. 2) mit den Chromatographiesäulen verbunden und durch Einschalten des Magnetrührers der Versuch gestartet. Durch die Höhe des Niveaugefäßes (Mischgefäßes) wurde der Flüssigkeitsdruck so eingestellt, daß ein Durchfluß von 5 ml in 40 Minuten eintrat. Das Vorratsgefäß wurde nach jeweils 45 Fraktionen (200 ml) gewechselt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Eluat erfolgte durch Messung der Extinktion bei $280 m\mu$ im Quarzspektralphotometer (Zeiß). Zu jedem Versuch wurde genau parallel ein Kontrollversuch mit der gleichen Austauschercharge und demselben Puffergradienten (aus demselben Mischgefäß) durchgeführt; auf diese Weise konnten Unterschiede durch Schwankungen der Temperatur, der pH-Werte der Puffer (durch wechselnden Gehalt an CO_2 und dergl.), durch abweichende Kapazität verschiedener Austauscherpräparate, unterschiedliche Vorbehandlung des Austauschers usw. mit Sicherheit vermieden werden. Die Zusammensetzung der Puffer des Vorratsgefäßes geht aus Tab. 2 hervor.

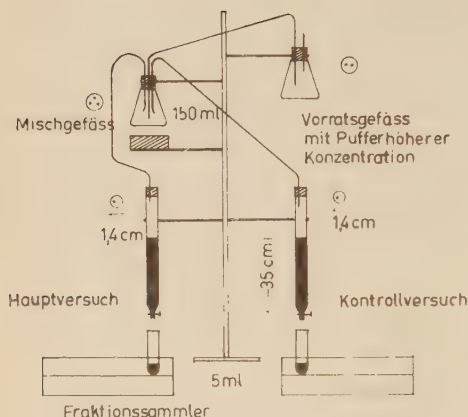


Abb. 2: Apparatur zur säulenchromatographischen Trennung der cytoplasmatischen Proteine

Tabelle 2. Molarität und pH-Werte der zur Ionenaustausch-Chromatographie verwendeten Puffer.

Ammonacetatlösungen geeigneter Konzentration (p.A.) wurden durch Zusatz von Essigsäure bzw. Ammoniak auf das gewünschte pH eingestellt.

Reihenfolge in der Eluat- flüssigkeit	pH	Konzentration
---	----	---------------

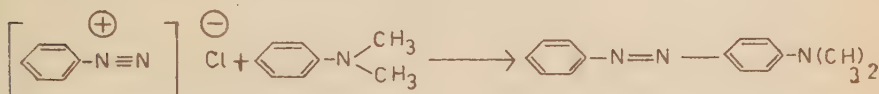
1	7,0	0,005 m
2	5,9	0,02 m
3	5,0	0,05 m
4	4,4	0,07 m

b) Herstellung von C^{14} - markiertem Buttergelb (DAB) aus C^{14} - Anilin.

Nach entsprechenden Vorversuchen mit inaktivem, frisch destilliertem Anilin wurde folgende Arbeitsvorschrift eingehalten:

0,02 ml konzentrierter Salzsäure (p.a., glas-destilliert) und 0,02 ml destilliertes Wasser wurden mit 3 mg Anilinsulfat

(0,1 m Curie, C^{14} -Markierung an allen C-Atomen des Moleküls) und 6,5 mg inaktivem, frisch hergestelltem Anilinsulfat unter Zusatz von 0,07 ml Eiswasser versetzt. Nach Kühlung im Eisbad setzten wir eine Lösung von 7,2 mg Natriumnitrit (p.a.) in 0,5 ml Wasser bei 0° in mehreren Portionen zu. Zu diesem Gemisch goß man die Lösung von 13,5 mg (=13,6 ml) Dimethylanilin in 11 ml norm. HCL hinzu und versetzte mit 17 mg Natriumacetat, $3H_2O$ (gelöst in wenig Wasser). Die gelbe Lösung wurde durch eine Mikrofritte filtriert und im Vacuum eingedunstet. Die Ausbeute war praktisch quantitativ.



Zur chromatographischen Reinigung des Rohrprodukts

wurde seine Lösung in wenig Benzol auf eine Säule (30 x 1,4 cm) von Aluminiumoxyd (standardisiert nach Brockmann), die mit einem Gemisch aus gleichen Volumina reinsten Benzols und Petroleum-Benzins (Kp. 135°) vorgewaschen war, aufgetragen und mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch nachgewaschen. Dabei bildeten sich drei scharf voneinander abgesetzte, durch unbeladenes Aluminiumoxyd getrennte Banden: Eine schmale, schmutziggelbe am oberen Rand, eine etwas breitere, rein rosa gefärbte etwas darunter und schließlich die breite, leuchtend gelbe, unterste Zone des Hauptproduktes, die beim Nachwaschen ins Filtrat wanderte (vgl. Abb. 3). Nach Eindampfen der Lösung im Rotationsverdampfer wurden mit dem Kristallisat Reinheitsproben und die Bestimmung der C^{14} -Aktivität vorgenommen. Schmelzpunkt (am Koflertisch) und Misch-Schmelzpunkt waren untereinander und mit dem inaktiven Vergleichspräparat (p.a.) identisch (115-118 $^{\circ}$).

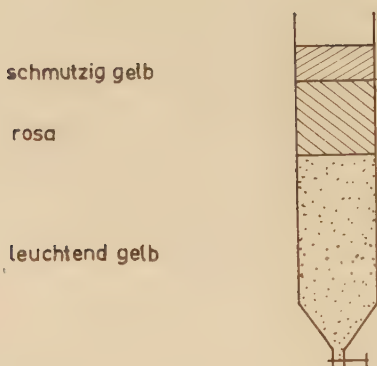


Abb. 3:
Chromatographische
Reinigung des DAB

C) Bestimmung der Radioaktivität.

a) Bestimmung der spezifischen Aktivität von C^{14} - DAB.

Etwa 100 μ g des synthetisierten C^{14} - Buttergelbs wurden in einem Tropfen Pyridin gelöst und unter Zusatz von zwei Tropfen Wasser auf der Oberfläche eines eloxierten Aluminiumschälchens (Durchmesser 2,84 cm, vgl. Abb. 4) in gleichmäßiger Schicht gespreitet. Nach Trocknen bis zur Gewichtskonstanz wurde das Differenzgewicht des C^{14} - Präparates mit der Mikrowaage auf 1 μ g genau bestimmt; die Messung der Aktivität erfolgte mittels eines Methan-Durchflußzählers. Um den reinen Meßfehler in der Größenordnung von etwa $\pm 1\%$ zu halten, wurden jeweils insgesamt 10.000 Impulse gezählt.

Man fand $6,6 \times 10^5$ Impulse/min/mg C^{14} - DAB. Unter den Versuchsbedingungen erfaßte man maximal 6% der effektiven Zahl der Impulse, entsprechend $1,1 \times 10^7$ Impulse/min/mg C^{14} - DAB. Für 15 mg Gesamtausbeute berechnet man $1,6 \times 10^8$ Impulse/min. Eingesetzt hatte man $2,2 \times 10^8$ Impulse (Gesamtaktivität des verwandten C^{14} Anilins); das entspricht einer Mindestausbeute von 73% der Theorie. Selbstabsorption und Koinzidenz waren unter den Meßbedingungen zu vernachlässigen.

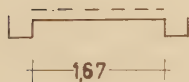
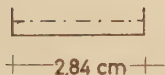
b) Bestimmung des C^{14} - Gehalts der durch Säulenchromatographie getrennten cytoplasmatischen Protein-Komponenten.

Etwa 2 mg des salzfreien, dialysierten Cytoplasmaproteins (bzw. eine adäquate Menge der säulenchromatographisch erhaltenen Einzelkomponente) wurden in 0,2 ml wasserfreier, analytisch-reiner Ameisensäure gelöst⁺ und 0,15 ml der Lösung auf ein Schälchen aus eloxiertem Aluminium mit Grenzwall (wirksame Oberfläche: Durchmesser 1,67 cm vgl. Abb. 4) in gleichmäßig dünner Schicht gespreitet. Nach Trocknen bis zur Gewichtskonstanz wurde das Differenzgewicht des Proteinfilms mit der Mikrowaage auf 1 μ g genau bestimmt, und darauf die C^{14} - Aktivität im Methan-Durchflußzähler bestimmt. Man zählte jeweils 10.000 Impulse insgesamt; die Selbstabsorption wurde auf Grund einer Eichkurve korrigiert.

Abb. 4. Zählschälchen zur Messung der Radioaktivität.

(- - - - Proteinfilm; - . - . - . Film von C^{14} -DAB)

Der Grenzwall verhindert die Bildung ungleichmäßiger Schichten und vermeidet ein Abfließen der Suspension über den inneren Rand hinaus.



⁺ In den ersten Versuchen wurde das mit Alkohol, Äther und Aceton getrocknete Protein in Aceton-Suspension mit einer 1%igen Kolophoniumlösung als Bindemittel in dünner Schicht über Filterpapierblättchen filtriert und anschließend aufgetrocknet; dieses Verfahren wurde jedoch später zugunsten der oben geschilderten Methoden aus Gründen der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit verlassen.

Ergebnisse und Diskussion

A) Einflüsse von (nicht markiertem) Buttergelb auf die Art und relativen Mengen der cytoplasmatischen Proteine (Chromatographie-Versuche).

Die Eluatkurve der säulenchromatographischen Trennung der cytoplasmatischen Proteine der Rattenleberzellen läßt 5 grössere Komponenten erkennen, die in Abb. 5 mit a bis e bezeichnet sind. Zufuhr von 16 bzw. 100 mg DAB bewirkte weder einen qualitativen noch einen deutlichen quantitativen Unterschied in der Form der Gipfel der Eluatkurve.

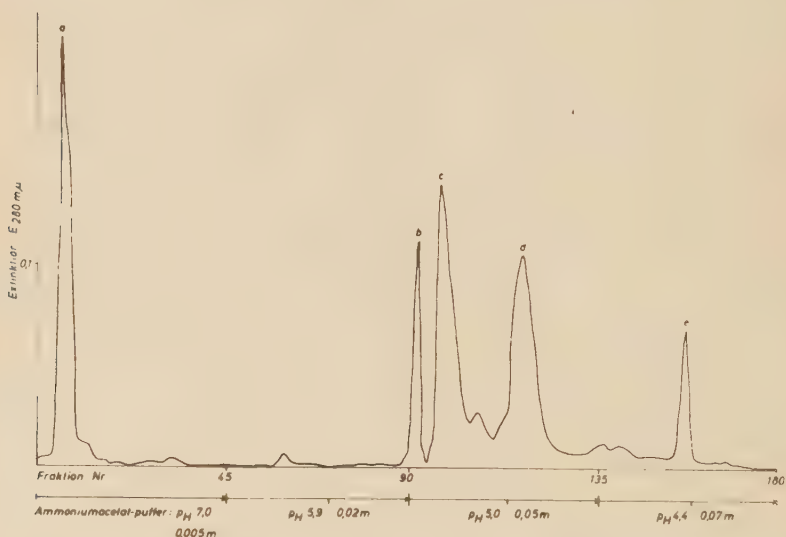


Abb. 5: Eluatkurve einer säulenchromatographischen Trennung der löslichen Cytoplasma-Proteine der Rattenleber (Kontrollversuch).

Nach Verabreichung von 1000 mg DAB war makroskopisch eine bedeutende Vergrößerung der Leber der Versuchstiere zu erkennen (von durchschn. 7 g auf 27 g für 250 g schwere Tiere). Die Oberfläche des Organs war knollig aufgetrieben; die

Schnittfläche zeigte kreisrunde Bezirke von graugelber Farbe. Die Lunge zeigte ebenfalls makroskopisch Metastasen. Histologische Präparate der Leber zeigten nach Befunden des Pathologischen Instituts der Universität München Gallengangs-wucherungen. Die Eluatkurve der Cytoplasma-Proteine aus Leberzellen der mit 1000 mg Buttergelb vorbehandelten Tiere unterscheidet sich von der normaler Tiere durch eine Verringerung der Komponente a und das Fehlen der Komponente e.

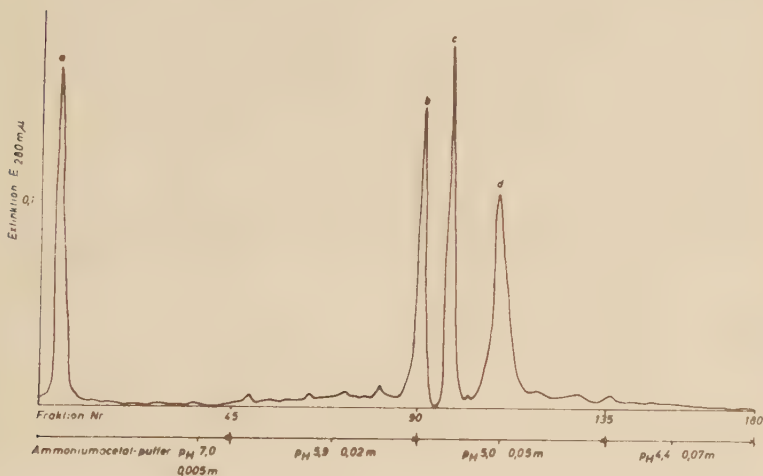
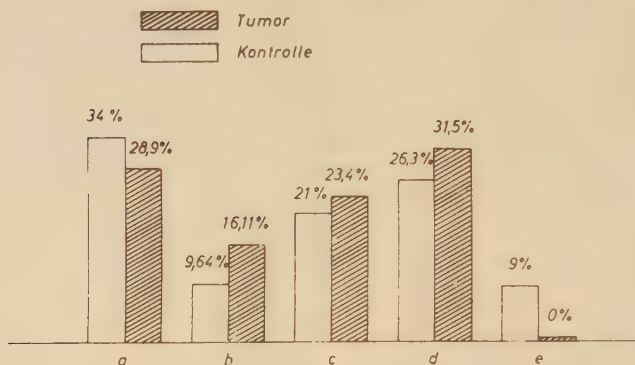


Abb. 6: Eluatkurve einer säulenchromatographischen Trennung der löslichen Cytoplasma-Proteine der Rattenleber (Hepatom-Leber).

Ein genauerer quantitativer Vergleich (Tab. 3) Abb. 7 zeigt ferner eine geringfügige Zunahme der Komponenten d, c und b.

Abb. 7: Prozentuale Verteilung der einzelnen Komponenten im löslichen Protein aus Rattenlebercytoplasma. Die Werte stellen den Durchschnitt aus allen Versuchen dar.



Tab. 3: Prozentuale Verteilung der Menge der einzelnen Proteinkomponenten aus Rattenleber-Cytoplasma bei Fraktionierung an DEAE-SF Cellulose-Säulen (Durchschnittswerte).

Zahl der Vers. Tiere	Verabreichte Dosis	Relative Mengen der Komponenten (%)				
		a	b	c	d	e
8	-	34	9,6	21	26	9
1	16	34	9	20	26	9
2	100	34	9	20	26	9
1	600	33	16	41		9
4	1 000	29	16	23	32	-

Da der Versuch zur Trennung der Cytoplasma-Proteine der mit 1000 mg DAB-vorbehandelten Tiere und der Kontrollversuche mit "normalen" Cytoplasma zugleich unter völlig identischen Bedingungen (s.S.14) durchgeführt wurde, entfällt die Möglichkeit, daß etwa Komponente d und e in einem Fall gemeinsam, das andere Mal getrennt eluiert wurden und das Fehlen der Komponente e unter gleichzeitiger Erhöhung der Menge von Fraktion d auf diese Weise erklärbar wäre. Hingegen ist nicht auszuschließen, daß die Buttergelbfütterung die Eigenschaften der Komponente e so verändert habe, daß diese Proteine nun bereits mit dem Gradienten zum Ammonacetatpuffer (0,05 m, pH. 5,0) und nicht erst mit dem nächstfolgenden Puffer (0,07 m, pH 4,4) aus der Säule eluiert wurden.

Spätere Versuche unseres Arbeitskreises außerhalb dieser Untersuchung haben ergeben, daß die von SOROF auf Grund des elektrophoretischen Verhaltens als "h-Proteine" bezeichneten Cytoplasma-Komponenten, die durch ihr Bindungsvermögen gegen DAB ausgezeichnet sind, bei Buttergelbfütterung chromatographisch nachweisbare Mengenverschiebungen erfahren (s. Einleitung S. 6 u. 7) und sich in der chromatographischen a-Fraktion finden: die elektrophoretische Beweglichkeit dieser Proteine stimmt mit den von SOROF angegebenen Werten überein. Daraus ergibt sich als praktisch besonders wichtige Folgerung aus den oben angeführten Ergebnissen die Möglichkeit, an Stelle der verlustreichen und technisch recht schwierigen Trennung der h-Proteine des Cytoplasmas in der "freien" (nicht durch Träger stabilisierten) Elektrophorese die Fraktionierung an dem schwach basischen Cellulose-Austauscher DEAE-SF unter Verwendung der angegebenen Puffer vorzunehmen. Da die a-Komponente praktisch unverzögert durch die Säule läuft, ist ihre Abtrennung einerseits einfach, rasch und in größeren Mengen durchzuführen; andererseits ist aus dem gleichen Grund ihre Unterteilung sicher noch weiterzutreiben. Zur Unterteilung in die als h_1 , h_2 , h_3 bezeichneten Subfraktionen, die sicherlich noch in die "langsamen", "mittleren" und "schnelleren" h_2 -Komponenten getrennt werden könnten, müßten weitere chromatographische Versuchsbedingungen ausfindig zu machen sein.

Der Befund SOROF's, wonach die gesamte "h"-Fraktion bei Buttergelbfütterung eine weniger deutliche Mengenveränderung erfährt, als die hauptsächlich betroffenen "langsamen h_2 -Komponenten", erklärt die mäßige Verminderung der chromatographischen a-Komponente selbst bei Verabreichung von 1000 mg DAB an die Versuchstiere und unterstreicht die Bedeutung weiterer chromatographischer Fraktionierungsversuche dieser Cytoplasma-Komponente.

B) Untersuchung der Bindung von C^{14} -markierten Dimethyl-amino-azobenzol an die cytoplasmatischen Proteine.

a) Vorversuche in vivo.

Ein Versuchstier erhielt insgesamt 15 mg C^{14} - DAB, gelöst in 1,5 ml Olivenöl, (davon 1,0 ml per os mit der Magensonde, 0,5 ml intraperitoneal) verabreicht, zwei weitere Versuchstiere 12 Tage lang je 8 mg C^{14} - DAB ($1,7 \times 10^5$ Impulse/min/mg). Vier Tage nach Beendigung der Buttergelbfütterung wurden die Tiere getötet und die cytoplasmatischen Proteine, wie oben beschrieben, durch Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose fraktioniert. Die Untersuchung der C^{14} - Aktivität der chromatographisch gewonnenen Komponenten ergab, daß die gebundenen Mengen an aktiver Substanz sehr gering waren. Es zeigte sich zwar, daß der relativ größte Teil an die Proteine der a-Komponente fixiert war, während die übrigen Komponenten kaum Aktivität aufwiesen; doch waren die Ausbeuten an zählbaren Impulsen zu gering, um genaue quantitative Aussagen machen zu können. Die geringen Ausbeuten an Aktivitäten gehen mit Sicherheit darauf zurück, daß a) bei oraler Zufuhr von Buttergelb der weitaus größte Teil, ohne resorbiert zu werden, im Darm ausgeschieden wird (eine Verabreichung größerer Mengen aktiven Materials war wegen der Kostbarkeit der Substanz nicht durchführbar, eine "Verdünnung" durch inaktives Material hätte in Bezug auf die Aktivitätsausbeute keinen Vorteil bedeutet) und daß b) außer der Leber auch andere Organe Buttergelb fixieren (MILLER und MILLER). Die Ausbeuten an Farbstoff im Lebercytoplasma betragen nur einen winzigen Bruchteil der verabreichten Menge, auch wenn über längere Perioden gefüttert wird (s. Einleitung). Demgegenüber sind die Verluste bei der Aufarbeitung geringfügig. Immerhin stehen die hier erzielten Ergebnisse qualitativ in Übereinstimmung mit den nachstehend beschriebenen Resultaten. Einen Überblick über die Ergebnisse zeigt Tab. 4 (umseitig).

Tab. 4: C^{14} - Aktivität in den chromatographisch getrennten Cytoplasmafraktionen bei in vivo-Versuchen:

I bei Verabreichung von 15 mg,
II bei Verabreichung von 96 mg C^{14} - DAB (in 12 Dosen).

Die Fraktionen b, c, d und e zeigten keinen Unterschied gegenüber dem Leerwert.

	Fraktion	Protein (mg/cm ²)	Impulse/min.
a	I	5,8/2,84	200
	II	3,4/2,84	255

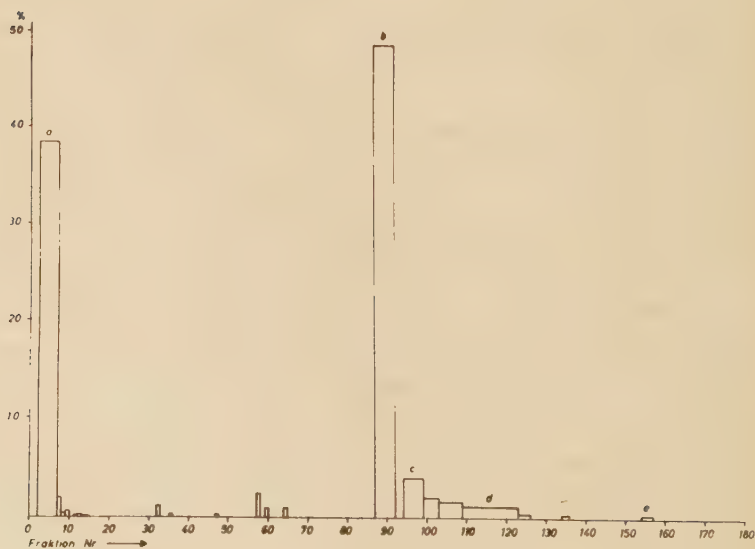
b) Versuche an der isoliert durchströmten Leber.

In dieser Versuchsordnung kreist das eingesetzte C^{14} - Buttergelb mit dem Blut, ohne in andere Organe als die Leber zu gelangen und ohne in Lymphspalten zu versickern; es bedarf der Resorption im Darm nicht und kehrt nach Durchströmung des Organs stets wieder dorthin zurück, wobei die Ausbeute des Einbaus in das Cytoplasma erheblich verbessert wird. 30 min. nach Beginn der Durchströmung (zur Versuchsordnung vgl. S. 11 u. 12) wurden 5 mg C^{14} - Buttergelb ($1,1 \times 10^7$ Impulse/min/mg), in 0,5 ml Äthanol gelöst, zu den 27 ml Blut des Vorratsgefäßes zugegeben. Nach 5 Stunden Versuchsdauer wurde die Leber mit 0,25 m Saccharoselösung unter einem Perfusionsdruck von 12 Torr von der Pfortader aus so weitgehend wie möglich blutleer gespült, darauf der Apparatur entnommen und, wie oben beschrieben, aufgearbeitet. Eine Übersicht über die spezifische Aktivität der chromatographisch getrennten cytoplasmatischen Proteine gibt Tab. 5; die prozentuale Verteilung des C^{14} - DAB auf die einzelnen Proteinkomponenten, wie sie sich unter Berücksichtigung der Gesamtmengen der einzelnen Komponenten a-b ergibt, zeigt Abb. 8.

Tab. 5: Spezifische Aktivität (Impulse/min/mg) der einzelnen Cytoplasmafraktionen nach Versuchen an der isoliert durchströmten Leber.

Komponente	Frakt. No	Spez. Aktivität
a	3 - 7	680
	8	7400
b	88 - 92	15300
c	95 - 99	4400
	100 - 103	1000
	104 - 109	2200
	110 - 117	510
d	118 - 123	420
	124 - 126	170
e	155 - 157	150

Abb. 8: Prozentuale Verteilung des C^{14} - Buttergelb in einzelnen Eiweißkomponenten der löslichen Proteine aus Rattenlebercytoplasma (5 Stunden nach Buttergelb-Verabfolgung).



Besonders aus Abb. 8 geht hervor, daß der Hauptteil der an Protein gebundenen C^{14} - Aktivität in den Fraktionen a und b wiedergefunden wird. Der hohe Anteil der Fraktion a entspricht sowohl den in vivo-Versuchen wie auch den Befunden von SOROF: denn in dieser chromatographischen Komponente findet sich der Hauptteil der Proteine mit der Beweglichkeit der h-Komponenten (siehe oben). Der beträchtliche Anteil an Aktivität in der Komponente b dürfte darauf zurückgehen, daß sich in der "Cytoplasmafraktion" trotz gründlichen Durchspülens der Leber mit Saccharoselösung stets noch geringe Mengen an Blut und damit an Serumalbumin finden, das durch eine außerordentlich hohe (unspezifische) Bindungsaffinität zu Farbstoffen, Anionen usw. ausgezeichnet ist. Bei der sehr hohen spezifischen Aktivität des eingesetzten C^{14} - DAB-Präparates ($4,6 \times 10^6$ Impulse/min) genügen bereits sehr kleine Mengen Albumin, das in Nähe der Fraktion b in der Eluatkurve austritt, um dieser Cytoplasma-Fraktion eine relativ große spezifische Aktivität zu verleihen. Bei den in vivo-Versuchen ist das nicht in diesem Maße der Fall; denn durch die allmähliche Resorption des C^{14} -Buttergelbs ist seine Konzentration im Serum stets sehr viel geringer als beim Versuch mit dem isolierten Organ, bei dem die aktive Substanz dem Blut in relativ hoher Konzentration direkt zugesetzt wird. Bei den in vivo-Versuchen kommt es erst durch die längere Versuchsdauer zu einer allmählichen Anreicherung von Buttergelb in den Leberzellen, die Aktivität des als "Vehikel" wirkenden Serumalbumins ist dagegen stets klein und trägt daher im Zeitpunkt der Aufarbeitung wenig zur Aktivität der b-Komponente des Cytoplasmas bei.

Auch durch Trägerelektrophorese konnte inzwischen festgestellt werden, daß sich in der b-Komponente wesentliche Mengen an Eiweißstoffen mit der Beweglichkeit von "h-Proteinen" nicht finden; sie gehören vielmehr zum überwiegenden Teil der "a-Fraktion" an.

Die Berechtigung zur Durchführung von Versuchen zum kurzfristigen Einbau von relativ größeren Mengen an Buttergelb in die Leberproteine ergibt sich aus den in der Einleitung zitierten neueren Befunden (s.S. 4 u. 5), wonach bei einmaliger Verabreichung hoher Dosen von Buttergelb die erreichten Farbstoffkonzentrationen vergleichbar und die betroffenen Leberproteine identisch waren mit denen bei Dauerfütterung mit kleineren Einzeldosen. Damit gewinnt die hier beschriebene Methode Wert für die Markierung der Leberproteine mit dem cancerogenen DAB, um den Chemismus des Bindungsvorganges und die Verschiebungen des Eiweiß-"Spektrums" auf diese übersichtliche und rasche Weise zu untersuchen.

Zusammenfassung.

1. Die löslichen Proteine des Cytoplasmas von Rattenleberzellen konnten durch Säulenchromatographie am kationischen Celluloseaustauscher Diäthylaminoäthylcellulose (DEAE-SF) durch Gradientenelution in 5 Hauptkomponenten a-e getrennt werden. Nach Verabreichung von 16 bzw. 100 mg Dimethylaminoazobenzol (DAB, Buttergelb) an Ratten konnte kein deutlicher Effekt auf die Form der Eluatkurve der Säulentrennung festgestellt werden; nach Zufuhr von 1000 mg DAB (in 10 mg Dosen) dagegen, wobei außer einer starken Lebervergrößerung auch Gallengangswucherungen auftraten, waren die Komponente a verringert, die Komponente b, c und d etwas vermehrt, die Komponente e fehlte ganz. Das geschilderte Trennungsvorgehen hat vor allem für die Anreicherung der sog. "h-Proteine" Bedeutung, die in der a-Fraktion vorliegen und Träger des Farbstoffbindungsvermögens sind.

2. Es wurde C^{14} -DAB aus C^{14} -Anilin synthetisiert und chromatographisch gereinigt; seine Bindung an die Cytoplasma-markierten Proteine wurde in vivo und an der isoliert mit Blut durchströmten Leber geprüft. Der Hauptteil der Aktivität wurde im Fall des in vivo-Versuchs von der chromatographischen a-Fraktion, im Fall des isolierten Organs von der a- und der b-Fraktion gebunden; der letztere Effekt wird dem Serumalbumin zugeschrieben. Die Bindung von C^{14} -DAB durch die a-Fraktion bestätigt den Befund, wonach die Farbstoff-fixierenden "h-Proteine" SOROF's dieser chromatographischen Komponente angehören.

3. Die Bedeutung der Versuchsanordnung der isoliert durchströmten Leber für Untersuchungen zum Chemismus der Buttergelbbindung durch die Leberproteine wird diskutiert und die Berechtigung solcher Versuche zum kurzfristigen Einbau des Farbstoffes begründet.

Literatur.

- 1) R. KINOSITA, Gann (jap) 30, 423, (1936)
- 2) MILLER, J.A., MILLER, E.C., und FINGER, G.C., Cancer Research 17, 387, (1957)
- 3) TERAYAMA, H., K.KUSAMA, K. TERUYA, S. KURODA und T. NAKAYAMA, Gann (jap) 49, 85 (1958)
- 4) HADDOW, A.R., J.C. HARRIS, G.A.R. KON und E.M.F. ROE, Philosophic Trans. Roy Soc. London, Ser. A. 241, 147 (1948)
- 5) DRUCKREY, H. und K. KÜPFMÜLLER, Z. Naturforsch. 3 b, 254 (1948)
- 6) KENSLE, C.J., SUGIURA, K. YOUNG, N. F., HALTER C.R. und RHOADS, C.P., Science 93, 308, (1941)
- 7) DRUCKREY, H., Arzneimittelforschung 1, 383, (1951)
- 8) BURDETTE, W.J., Cancer Res. 15, 201, (1955)
- 9) MILLER, J.A., und MILLER, C.E., Cancer Res. 7, 39, (1957)
- 10) CONNEY, A.H., MILLER, E.C. und MILLER, A.J., Cancer Res. 16, 450, (1956)
- 11) CONNEY, A.H., BROWN, R.R., MILLER, J.A. und MILLER, E.C. Cancer Res. 17, 628, (1957)
- 12) HULTIN, T., Exptl. Cell. Res. 13, 47, (1957)
- 13) MILLER, J.A. und MILLER, C.E., Cancer Res. 7, 39, (1947)
- 14) MILLER, J.A. und SAPP, R.W., MILLER, C.E., Cancer Res. 12, 547, (1952)
- 15) MILLER, J.A. und MILLER, C.E., Cancer Res. 12, 547, (1952)
- 16) HULTIN, T., Exptl. Cell. Res. 10, 71, 697, (1956);
HULTIN, T., Exptl. Cell. Res. 13, 47, (1957)
- 17) MILLER, J.A. und MILLER, C.E., Cancer Res. 7, 39, (1947)
- 18) Zusammenfassung bei MILLER, J.A. und MILLER, C.E., Cancer Res. 1, 339, (1953)
- 19) K. KUSAMA und K. TERAYAMA, Gann (Jap) 48, 181, (1957)
- 20) HUGHES, P.E., Cancer Res. 19, 472, (1959)
- 21) TERAYAMA, K., KUSAMA, K. und AOKI, T., Gann (jap)
- 22) PRICE J.M., MILLER, J.A. und MILLER, C.E. und G.M. WEBER, Cancer Res. 10, 18, (1950)
- 23) SOROF, S., COHEN, P.P., MILLER, J.A., MILLER, C.E., Cancer Res. 11, 383, (1951)
- 24) SOROF, F., YOUNG, E.M. und OTT, M.G., Cancer Res. 18, 33, (1958)
- 25) vgl. aber HOFFMANN, H.E. und SCHECHTMANN, A.M., Cancer Res. 12, 129, (1952)
- 26) SOROF, S., GOLDBER, R.H. und OTT, M.G., Cancer Res. 14, 890, (1954)

Lebenslauf.

Am 19. Februar 1935 wurde ich in Teheran als Sohn des Kapitäns Golanreza Amiri und seiner Frau Batul geboren. Ich besuchte 12 Jahre lang die Volks- und Oberschule, welche letztere ich 1954 mit der Reifeprüfung in Teheran absolvierte. Dann wandte ich mich dem Medizinstudium zu und besuchte die Universitäten Teheran und München.

Im Februar 1957 bestand ich in München das ärztliche Vorexamen. Am 1. Juni 1960 habe ich das Medizinstudium mit dem Staatsexamen in München abgeschlossen.

- 27) HULTIN, T., Exptl. Cell. Res. 10, 71, (1956; 10, 697, (1956)
- 28) GELBOIN, H.V., MILLER, J.A. und MILLER, E.C., Cancer Res. 18, 608, (1958)
- 29) TERAYAMA, H., KUSAMA, K. und AOKI, T., Gann (jap), 49, 97, (1958)
- 30) HULTIN, T., Exptl. Cell. Res. 13, 47, (1947)
- 31) GELBOIN, H.V., MILLER, J.A. und MILLER, E.C., Biochem., Biophys. Acta 27, 655 (1958) Proc. Am. Ass. Cancer Res. 2, 300, (1958)
- 32) HUGHES, P.E., Australian, J. Exp. Biol. Med. Sci. 35, 173, (1957)
- 33) SOROF, S. und COHEN, P.P., Cancer Res. 11, 376, (1951)
- 34) SOROF, S., COHEN, P.P., MILLER, J.A. und MILLER, E.C., Cancer Res. 11, 383, (1951)
- 35) PETERMANN, M.L., MIZEN, N.A. und HAMILTON, M.G., Cancer Res. 16, 620, (1956)
- 36) ARCOS, J.C. und ARCOS, M., Biochem. Biophys. Acta 28, 9, (1958)
- 37) WEILER, E.C., Naturforsch. 11 o, 31, (1956)
- 38) HUGHES, P.E., LOUIS, C.J., DINEEN, J.K. und SPECTOR, W. G., Nature 180, 289, (1957), HUGHES, P.E., Cancer Res. 18, 426, (1958)

